



Otimização das condições de extração de senosídeos por soluções hidroetanólicas das folhas de *Senna alexandrina* MILL empregando planejamento fatorial

Alexandre de Almeida Lopes Severo¹; Thiago Pessoa de Souza²; Larissa Araújo Rolim¹; José Lamartine Soares Sobrinho¹; Flávia P. Morais de Medeiros³; Pedro José Rolim Neto^{1*}

¹Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos – LTM, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

²Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

³Faculdade Pernambucana de Saúde.

RESUMO

Senna alexandrina MILL é um arbusto alto, originário da Arábia, amplamente cultivado na Índia e largamente utilizado como laxativo na constipação aguda e em casos em que a defecação é aconselhável, como após intervenção cirúrgica antes ou depois de operação abdominal, sendo empregado na forma de pós, xaropes, comprimidos e cápsulas. Como estas formulações geralmente são preparadas à partir de derivados do extrato líquido, torna-se fundamental para a qualidade e eficácia que este tenha seu processo de extração otimizado. O presente trabalho teve por objetivo determinar as melhores condições de extração, por soluções hidroetanólicas, das folhas de *Senna alexandrina*, empregando planejamento fatorial completo com ponto central 2³ (três fatores e dois níveis) onde os níveis dos fatores foram codificados como -1 (baixo), 0 (ponto central) e 1 (alto), e metodologia de superfícies de respostas, para avaliar a influência do solvente, da quantidade de planta e do método de extração sobre o teor de derivados hidroxiantracênicos expressos em senosídeo B (SB) e sobre o resíduo seco (RS) nos extratos líquidos preparados. Foram realizados planejamentos experimentais completos, sendo um realizado pelo deslocamento dos níveis, após a análise do primeiro planejamento. Após a análise da superfície de resposta do planejamento com os níveis deslocados encontrou-se a faixa de melhor extração dos derivados hidroxiantracênicos expressos em senosídeo B com a melhor relação SB/RS, utilizando o solvente etanol/água a 60% V/V, 15 gramas da planta, e extração com aquecimento e agitação.

Palavras-chave: Planejamento Fatorial. Extração. *Senna alexandrina*. Otimização de Processo.

INTRODUÇÃO

A *Senna alexandrina* MILL (*Cassia angustifolia* Vahl), popularmente conhecida no Brasil como sene, é um arbusto de crescimento rápido cujas folhas e sementes são extensivamente usadas para aplicações farmacêuticas (Chaubey & Kapoor, 2001). Seus principais constituintes ativos são da família dos glicosídeos hidroxiantracênicos, aos quais são atribuídos seu uso na terapêutica da constipação (ESCOP, 1997). Assim como a planta *in natura*, os extratos de sene, também são utilizados na terapêutica da constipação (WHO, 1999). A constipação intestinal é a queixa digestiva mais comum na população, sendo responsável por cerca de 2,5 milhões de visitas médicas por ano (Sonnenberg & Koch, 1989), pelo gasto de vários milhões de dólares com laxantes e, indiretamente, por 92 mil hospitalizações anualmente nos Estados Unidos (Stewart et al., 1999). No Brasil, não existem dados publicados de prevalência na população, no entanto, estudos no sul do país indicam uma prevalência de cerca de 15% na população masculina e 35% na feminina (Collet et al., 2010).

No Brasil encontram-se registrados cerca de 500 medicamentos fitoterápicos, dos quais mais de 70% apresentam-se como formas farmacêuticas sólidas (Carvalho et al., 2008). A matéria-prima para estes produtos é constituída por extratos secos, os quais dentre as suas vantagens incluem a maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, mais fácil padronização, maior concentração de compostos ativos e mais elevada capacidade de transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas sólidas. Estes extratos secos são geralmente produzidos a partir do extrato líquido por métodos de secagem, como por aspersão (*spray drying*). A secagem por *spray drying* consiste em três etapas fundamentais. Na primeira fase, o fluido é disperso como gotículas, produzindo uma grande área superficial. Na segunda, ocorre contato destas com uma corrente de ar aquecido,

Autor correspondente: Pedro José Rolim Neto - Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos - Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco/UFPE - Av. Prof. Arthur de Sá, s/nº - Cidade Universitária - CEP: 50740-521 - Recife - PE - Brasil - telefone fax: (81) 3272-1383 - e-mail: pedro.rolim@pq.cnpq.br

havendo transferência de calor. Na terceira etapa acontece a evaporação do solvente e a formação da partícula sólida (Rankell et al., 2001). No processo de secagem por aspersão um dos fatores que influenciam a secagem é a concentração de sólidos presentes no extrato líquido, devido ao alto custo do processo, a secagem deve operar com a máxima concentração de sólidos possibilitando uma utilização adequada do calor utilizado para a secagem (Marsters, 1985). Baixas concentrações de sólidos requerem que grande quantidade de solvente seja eliminada ou que grandes quantidades de adjuvantes de secagem sejam utilizados, visando à formação de partículas maiores e a otimização do processo (De Campos, 1996). Por outro lado, a adição de adjuvantes de secagem diminui o teor de ativo no extrato seco, tornando-se um limitante para a preparação de formas farmacêuticas que precisam conter uma determinada concentração de ativos por unidade farmacotécnica. O método de preparo do extrato líquido, portanto é de grande importância para a obtenção de um extrato seco de qualidade, com uma relação otimizada entre resíduos sólidos e ativos.

Infelizmente, na prática o método de preparo do extrato líquido de sene descrito nas Farmacopeias aceitas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) requer um grande tempo para a percolação e concentração do extrato por evaporação e mesmo assim não se consegue obter uma extração considerável de ativos com uma quantidade mínima de resíduos. A partir desta dificuldade, este trabalho teve como objetivo a otimização do método extrativo de sene de forma a obter uma boa relação de ativos, senosídeos totais expressos em senosídeo B (SB), e de resíduo seco (RS), utilizando o planejamento fatorial, no qual estão envolvidos k fatores (ou variáveis) cada um deles presentes em diferentes níveis.

O planejamento fatorial é utilizado para se obter as melhores condições operacionais de um sistema, realizando-se um número menor de experimentos quando comparado com o método univariado (Brasil et al, 2007; Montgomery, 2004). Neste contexto, foi utilizado no presente trabalho para se definir os melhores níveis das variáveis: método de extração, concentração de etanol nas soluções extrativas e relação material vegetal/ solvente extrator.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Foram utilizadas folhas de *Senna alexandrina* MILL, fornecida pela empresa Santosflora Comercio de Ervas Ltda, São Paulo- SP, Brasil, lote: SENT01/1208, originária do nordeste indiano, colhida em fevereiro de 2010. As folhas foram coletadas inteiras em igual estágio de desenvolvimento e com ausência de depredação. O material vegetal fresco foi lavado e posteriormente posto para secagem à sombra. Após secagem, o material foi pulverizado e tamisado para obtenção de pó grosso, segundo especificação da Farmacopeia Brasileira (2010).

Caracterização da Matéria-prima vegetal

As análises de granulometria, determinação de água, identificação e teor foram realizadas conforme a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010).

Análise granulométrica

Cerca de 25 g da amostra foram submetidos à passagem por tamises, com aberturas de malha de 2.000, 850, 600, 425 μ m, montados nesta ordem, com o tamis de maior abertura sobre o de abertura menor. A tamisação foi realizada a 60 vibrações por segundo durante 15 minutos em tamisador (Bertel). Em seguida, as frações retidas nos tamises e no coletor foram pesadas. O percentual retido em cada tamis foi calculado utilizando a equação [1].

$$\% \text{ Retida pelo tamis} = \frac{P_1}{P_2} \times 100 \quad [1]$$

Onde:

P1 = Peso da amostra retida em cada tamis (em gramas);

P2 = Soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor(em gramas);

100 = Fator de porcentagem.

Determinação de água

Cerca de 5 g da amostra foram exatamente pesados em balança analítica (AND HR 200, capacidade máxima 210 \pm 0,0001 g), e transferidos para pesa-filtro tarado, previamente dessecado a 105 °C por 5 horas. A amostra foi então dessecada a 105 °C por 5 horas, até peso constante. Foi utilizada nas dessecações a estufa (Marconi MA-033/1). A porcentagem de água na amostra foi calculada de acordo com a equação [2].

$$\% \text{ de água} = \frac{5 - P_c}{5} \times 100 \quad [2]$$

Onde:

Pc = Peso da amostra ao atingir peso constante (em gramas)

5 = Massa da amostra inicial (em gramas)

100 = Fator de porcentagem

Cromatografia em camada delgada (CCD)

Foi utilizada sílica-gel GF₂₅₄ com espessura de 250 μ m, como fase estacionária, e a mistura de acetato de etila, álcool n-propílico, água e ácido acético glacial (40:40:30:1, v/v) como fase móvel. Aplicou-se, separadamente, em forma de banda, 10 μ L da *Solução (1)* e 10 μ L da *Solução (2)*, recentemente preparadas. A *Solução (1)* foi preparada a partir de 0,5 g do pó da planta em 5 mL de mistura de etanol e água (1:1), aquecida à ebulição e filtrada. Para o preparo da *Solução (2)*, foram dissolvidos separadamente 2,5 mg de senosídeo A e 2,5 mg de senosídeo B em 1 mL de metanol e 1 mL de água. O cromatograma foi desenvolvido e a placa removida para secar ao ar. Posteriormente a placa foi nebulizada com ácido nítrico a 25% e aquecida por 10 minutos a 120 °C. Ao esfriar, a placa foi novamente nebulizada, desta vez com solução de hidróxido de potássio a 5% (p/v), até o aparecimento de manchas.

Determinação do teor de derivados hidroxiantracênicos

Cerca de 0,15 g da droga pulverizada foram exatamente pesados em balão de fundo redondo com boca esmerilhada. Em seguida, foram adicionados 30 mL de água, e o conjunto foi pesado em balança analítica. O

conjunto pesado foi aquecido em manta de aquecimento, sob refluxo, durante 15 minutos. Após resfriamento, o conjunto foi novamente pesado e o peso inicial foi restabelecido com água, e em seguida foi filtrado desprezando-se os 10 mL iniciais. Exatamente 10 mL do filtrado foram transferidos para um funil de separação de 50 mL, onde foi adicionada uma gota de ácido clorídrico 2 M e em seguida lavado com três porções de 5 mL de clorofórmio. A fase clorofórmica foi rejeitada. A fase aquosa foi centrifugada durante 10 minutos a 2000 rpm. A seguir, 4 mL do líquido sobrenadante foram transferidos para balão de fundo redondo com boca esmerilhada. O pH da solução foi ajustado para 7,0 a 8,0 com cerca de 80 µL de solução de carbonato de sódio a 5% (p/v) e depois foram adicionados 8 mL de solução de cloreto férrico a 10,5% (p/v). Após adição do cloreto férrico, o conjunto foi aquecido, sob refluxo e agitação, em banho-maria durante 20 minutos. Passados 20 minutos, foram adicionados 0,4 mL de ácido clorídrico concentrado e o aquecimento foi mantido por mais 20 minutos, agitando-se frequentemente, até dissolução do precipitado. Após resfriamento a solução foi transferida para funil de separação de 50 mL, e extraída com 10 mL e duas vezes de 7 mL de éter etílico, previamente utilizado para lavar o balão de fundo redondo. Os extratos etéreos foram reunidos e lavados com duas vezes de 10 mL de água. A camada etérea foi transferida para balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com éter etílico. A *solução amostra* foi preparada evaporando-se 5 mL da solução etérea, em banho-maria, até resíduo, que foi então ressuscitado com 5 mL de acetato de magnésio a 0,5% (p/v) em metanol. Imediatamente após o seu preparo, a absorvância da *solução amostra* foi medida em espectrofotômetro UV-Visível (Micronal, B582), em 515 nm, utilizando metanol para ajuste do zero. O teor de derivados hidroxiantracênicos foi calculado como senosídeo B, utilizando 240 como valor de absorvância específica, segundo a equação [3].

$$SB = \frac{A \times 0,781}{m} \quad [3]$$

Onde:

SB = derivados hidroxiantracênicos;

A = absorvância da *Solução amostra*;

m = massa da amostra considerando a determinação de água.

Planejamento experimental

O planejamento experimental foi realizado em duas etapas. A primeira foi realizada utilizando-se um planejamento fatorial completo 2³ adicionado de um ponto central, com o objetivo de determinar quais fatores são significativos (p<0,05) na obtenção das melhores respostas para a realização de um novo planejamento. Após a triagem dos fatores com o planejamento fatorial, uma análise de superfície de resposta empregando planejamento composto central foi realizada para se obter as melhores condições operacionais com melhor relação entre SB/RS (teor de derivados hidroxiantracênicos expressos como senosídeo B/ resíduo seco).

Os fatores e os níveis estudados foram: A - massa de planta utilizada nos níveis 10, 12,5 e 15 (respectivamente 1, 0 e -1); B - concentração da solução hidroetanólica nos níveis 40, 50 e 60% (respectivamente 1, 0 e -1); e C

- método de extração nos níveis maceração, e maceração com aquecimento e agitação (respectivamente 1 e -1).

Cada ensaio realizado durante os dois planejamentos foi obtido de forma aleatória com o objetivo de evitar que fatores indesejáveis contaminem os efeitos investigados. E o tratamento estatístico dos dados foi realizado utilizando o software MINITAB® 14.

Preparação dos extratos

Método 1: Maceração (modificada)

A quantidade de amostra de planta (10, 12,5 ou 15 g) foi macerada com 100 mL do solvente extrativo (solução hidroetanólica 40, 50 e 60%) durante 2 dias.

Método 2: Maceração com aquecimento e agitação

O termo decocção refere-se à extração com água! Pode-se referir-se a este método como maceração com aquecimento e agitação ou digestão com agitação.

A quantidade de amostra de planta (10, 12,5 ou 15 g) foi aquecida em aquecedor Quimis® modelo Q-261-2, com 100 mL do solvente extrativo (solução hidroetanólica 40, 50 ou 60%) a uma temperatura de 60 °C, durante 30 minutos, com agitador magnético.

Avaliação das respostas

Determinação do resíduo seco

Foram transferidos 2 mL de extrato para placa de Petri, os quais foram evaporados até *secura* em banho-maria e posteriormente dessecados em estufa Marconi MA-033/1 a 105 °C, por 3 horas. Após dessecar, a amostra foi esfriada em dessecador, sob pentóxido de fósforo. Após esfriar, a amostra foi pesada em balança analítica AND®-HR 200. O resíduo seco foi calculado em porcentagem sobre o volume inicial (2 mL).

Determinação do teor de derivados hidroxiantracênicos nos extratos

O método de análise do teor de *derivados hidroxiantracênicos* foi validado conforme a RE nº 899, de 29/05/2003 - Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos da ANVISA, tendo como referência a monografia para o Extrato Seco de Sene da Farmacopeia Portuguesa 9ª Edição (2010), sendo alterado apenas para extrato fluido.

Os cálculos de teor de derivados hidroxiantracênicos calculados em senosídeos B foram feitos segundo a fórmula:

$$\frac{A \times 4,167}{m}$$

Tomando 240 como valor da absorvância específica do senosídeo B (0,01mg/mL).

A = absorvância em 515 nm.

m = massa da tomada de ensaio, em g.

RESULTADOS

A análise granulométrica mostrou que 100% das partículas do pó passaram pelos tamises com abertura nominal de malha de 2000 µm e 850 µm, e pelo menos

50% ficaram retidas no tamis com abertura nominal de 425 µm, o que está em conformidade com a especificação de “pó grosso”, segundo a descrição farmacopeica (FB 5, 2010). A determinação de água apresentou um resultado de 7,5% e está em conformidade ao teor máximo de 10 % determinado na monografia da planta. O cromatograma obtido com a solução 1 (amostra) apresentou duas manchas de coloração castanho avermelhadas similares em tamanho e coloração às manchas obtidas com a solução 1 (padrão) referentes ao senosídeo B (R_f aproximadamente 0,2) e ao senosídeo A (R_f aproximadamente 0,4), demonstrando a presença dos marcadores para o vegetal. A determinação dos ativos se apresentou em conformidade com o mínimo de 2,5% de derivados hidroxiantracênicos expressos como senosídeo B (Brasil, 2010), assegurando a qualidade para estes marcadores. Os resultados para a caracterização da matéria-prima vegetal estão agrupados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados da caracterização da matéria-prima vegetal

Análise	Resultado
Análise granulométrica	100% das partículas passaram pelos tamises de 2.000 µm e 850 µm e 50% ficaram retidas no tamis de 425 µm
Determinação de água	7,5%
CCD	Duas manchas castanho avermelhadas com valores de R_f 0,2 (senosídeo B) e 0,4 (senosídeo A)
Teor de ativos	2,8% de derivados hidroxiantracênicos expressos em senosídeo B.

Após a caracterização da matéria-prima vegetal, deu-se início à otimização das condições de operação do processo extrativo seguindo um planejamento fatorial composto central 2³ para uma triagem dos fatores significativos. Os valores da determinação de resíduo seco (RS) e derivados hidroxiantracênicos expressos em senosídeo B (SB) dos extratos obtidos das folhas de *C. angustifolia* e os resultados para cada variação observada estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Planejamento fatorial completo 23 com três pontos centrais. O valor de SB e RS (%) corresponde ao resultado experimental.

Experimentos	A	B	C	SB	RS
1	-1	1	1	0,310	3,80
2	-1	1	-1	0,290	3,75
3	0	0	-1	0,295	4,05
4	1	-1	1	0,287	4,12
5	1	1	1	0,335	4,15
6	-1	-1	1	0,275	3,79
7	0	0	-1	0,293	4,00
8	1	-1	-1	0,288	4,11
9	0	0	1	0,284	3,98
10	1	1	-1	0,318	4,15
	Níveis				
Fatores	-1		0	1	
A: Quantidade de planta	10 g		12,5 g	15 g	
B: Concentração de etanol	40%		50%	60%	
C: Método de extração	Maceração		-----	Maceração com aquecimento e agitação.	

Na Figura 1a é apresentado o gráfico de Pareto dos efeitos padronizados em $p = 0,05$. Todos os efeitos padronizados estão em valores absolutos. Todos os efeitos para a resposta SB que apresentaram valores maiores que 12,71 ($p = 0,05$), que se localizam à direita da linha tracejada, foram significativos.

A Figura 1b mostra a curva da distribuição de probabilidade normalizada para os efeitos padronizados para a resposta SB, para se avaliar cada fator e suas interações no processo de extração da planta. Este gráfico é dividido em duas regiões, a com porcentagem inferior a 50%, onde os fatores e interações apresentam coeficientes negativos e a região com porcentagem acima de 50%, onde os fatores e as interações apresentam coeficientes positivos.

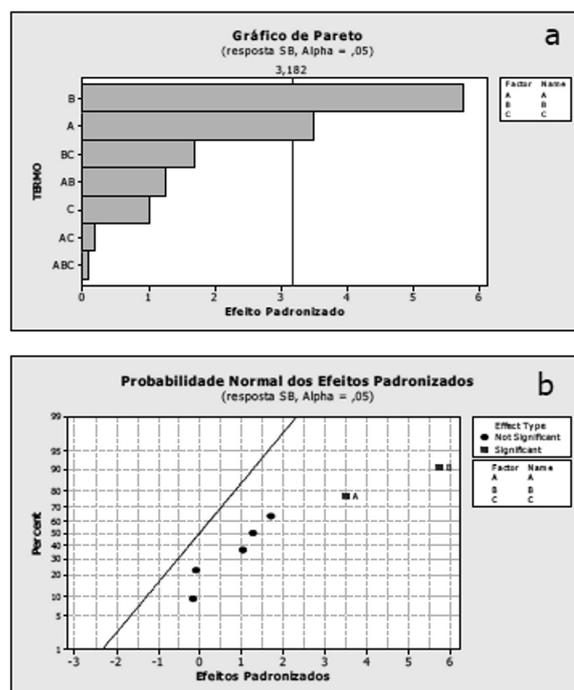


Figura 1. a- Gráfico de Pareto para os efeitos padronizados em $p=0,05$ para a resposta em SB; b- Probabilidade normal dos efeitos padronizados em $p=0,05$ para a resposta em SB. A linha tracejada em 50% de probabilidade divide os efeitos negativos dos positivos

Analisando-se os gráficos da Figura 1, pode-se dizer que a concentração da solução hidroetanólica (fator B) foi a variável mais importante do processo global da extração. O valor positivo de seu coeficiente significou que a extração foi favorecida em valores da concentração de solução hidroetanólica próximo a 60%. Desta forma a passagem do nível inferior para o nível superior na concentração de etanol na solução extrativa influencia positivamente no teor de SB. A quantidade de planta utilizada também favoreceu a extração de SB de maneira positiva.

A Figura 2a e 2b mostra respectivamente o gráfico de Pareto dos efeitos padronizados em $p = 0,05$ para a resposta RS e a curva da distribuição de probabilidade normalizada para os efeitos padronizados. No gráfico de Pareto todos os efeitos para a resposta RS que apresentaram valores maiores que 12,71 ($p = 0,05$), que se localizam à direita da linha tracejada, foram significativos.

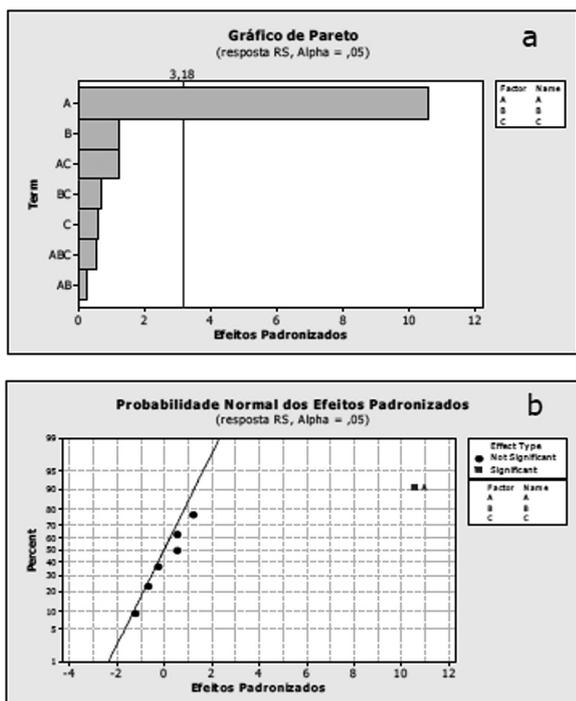


Figura 2. a- Gráfico de Pareto para os efeitos padronizados em $p=0,05$ para a resposta em RS; b- Probabilidade normal dos efeitos padronizados em $p=0,05$ para a resposta em RS. A linha tracejada em 50% de probabilidade divide os efeitos negativos dos positivos;

Analisando-se os gráficos da Figura 2, pode-se dizer que a quantidade de massa da planta (fator A) utilizada na preparação dos extratos foi a variável mais importante do processo global da extração para a resposta RS. O valor positivo de seu coeficiente significou que o teor de RS foi favorecido em valores da quantidade de planta próximo a 15 g. Desta forma a passagem do nível inferior para o nível superior da quantidade de planta influencia positivamente o teor de RS.

Entre os fatores principais, a passagem do nível inferior para o nível intermediário na massa da planta, proporcionou um aumento tanto no teor de derivados hidroxiantracênicos expressos em senosídeo B (SB) quanto no resíduo seco (RS). Assim, o aumento na massa de planta influencia positivamente no teor de SB e no RS.

Após realização da triagem dos fatores utilizando o planejamento fatorial completo 2^3 , uma análise de superfície de resposta empregando planejamento composto central foi realizada de acordo com os experimentos descritos na Tabela 3, para obter as melhores condições operacionais com melhor relação SB/RS. Os níveis dos fatores escolhidos foram ajustados, baseados nos experimentos prévios de planejamento fatorial descrito acima, usando o método de extração por maceração com aquecimento e agitação, pois apresentou melhores resultados. Os novos níveis avaliados da massa de planta e concentração de solução hidroetanólica estão descritos na tabela 3.

Na Figura 3a é mostrada a superfície de resposta SB em função da quantidade de planta e concentração da solução hidroetanólica. Foi observado que a massa da planta entre 17,5 e 20 g não apresentou efeito significativo na extração de SB. Na Figura 3b é apresentada a curva

de contorno da resposta (SB) para a quantidade de planta versus concentração da solução hidroetanólica. Foi observado que os melhores resultados ocorreram em maiores concentrações, próximo a 60% da concentração de etanol no nível central do fator quantidade da planta, confirmando os dados da Figura 3a.

Tabela 3. Análise de superfície de resposta empregando planejamento composto central contendo 13 experimentos e 2 fatores (Q_p , C_c). O método de extração foi maceração com aquecimento e agitação.

Experimentos	A	B	SB	RS
1	0	0	0,3250	4,21
2	0	-1	0,3330	4,20
3	-1	1	0,3270	4,12
4	-1	0	0,3250	4,11
5	0	0	0,3230	4,18
6	0	1	0,3270	4,15
7	1	0	0,3250	4,41
8	0	0	0,3250	4,21
9	1	-1	0,3300	4,43
10	-1	-1	0,3383	4,10
11	1	1	0,3210	4,10
12	0	0	0,3230	4,22
13	0	0	0,3250	4,19

Níveis	
Fatores	
A: Quantidade de planta	-1 0 1
B: Concentração de etanol	60% 65% 70%

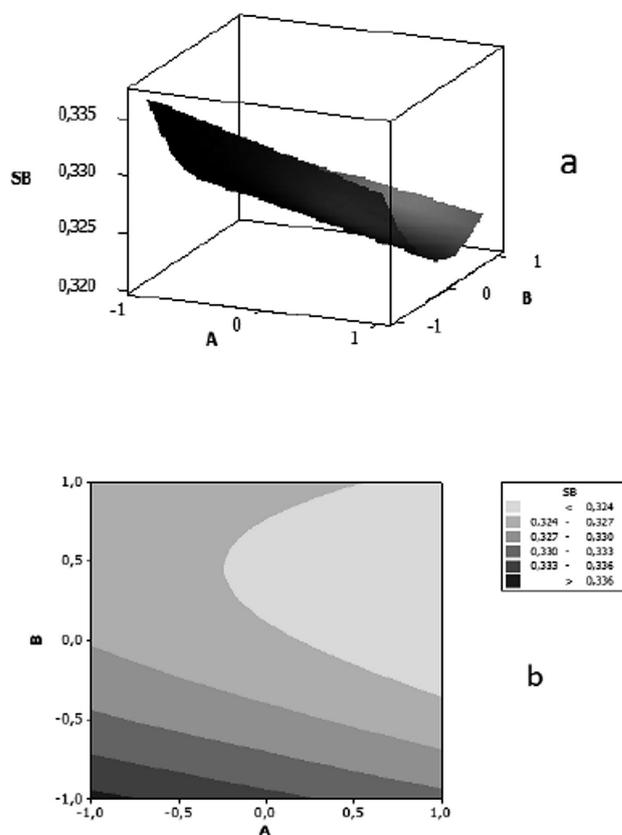


Figura 3. a- Superfície de resposta para a extração de SB versus Q_p (A) e C_c (B); b- curvas de contorno para SB, Q_p (A) versus C_c (B).

Na Tabela 4 é apresentada a análise de regressão da superfície de resposta para a extração de SB. Apenas a concentração da solução hidroetanólica (C_e) e C_e^2 foram significativas ($p < 0,05$). Todos os demais fatores não foram significativos, pois apresentaram probabilidade maior que 0,05. O coeficiente de correlação ao quadrado (R^2) foi de 94,9%. O aumento da concentração da solução hidroetanólica não significou em um aumento do teor de SB sendo, seus maiores valores próximos ao nível -1, como observados na curva de contorno da figura 3b.

Tabela 4. Análise de regressão da superfície de resposta para a SB.

Termo	Coefficiente	SE Coeficiente	P
Constante	0,324438	0,000854	0,000
A	-0,002383	0,000840	0,250
B	-0,004383	0,000840	0,007
A*A	-0,000033	0,001238	0,980
B*B	-0,008824	0,001238	0,005
A*B	0,001500	0,001070	0,594
S = 0,002058	R ² = 94,9%		

Analisando-se a Figura 3 e os dados da Tabela 4, pode-se concluir que a faixa ótima de massa da planta adicionada para a extração de SB é de 15 g. A quantidade extraída de SB aumenta com a concentração da solução hidroetanólica, podendo ser expressa pela Equação:

$$SB = 0,324438 - 0,004383C_e - 0,008824C_e^2. (R^2 = 94,90\%)$$

A análise da superfície de resposta com relação ao resíduo seco obtido no extrato fluido preparado está apresentada na figura 4a e 4b e a análise de regressão da superfície de resposta para a extração de RS na tabela 5.

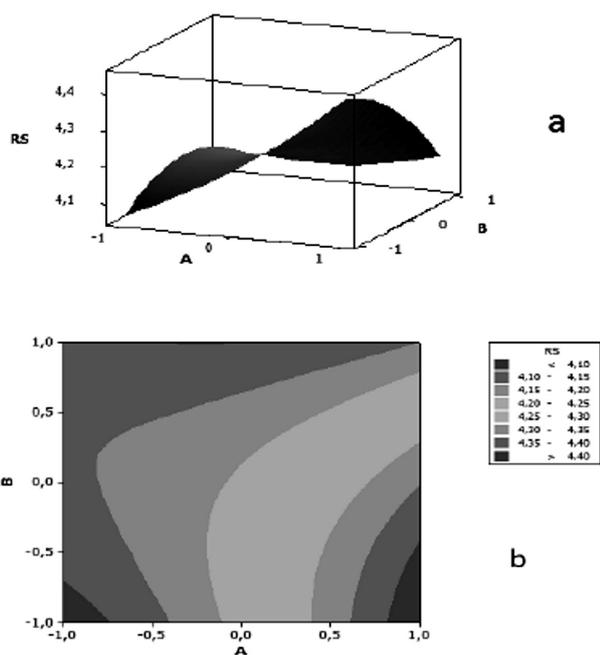


Figura 4. a- Superfície de resposta para a extração de RS versus Q_p (A) e C_e (B); b- curvas de contorno para RS, Q_p (A) versus C_e (B).

Tabela 5. Análise de regressão da superfície de resposta para a RS.

Termo	Coefficiente	SE Coeficiente	P
Constante	4,20828	0,01803	0,000
A	0,10167	0,01772	0,001
B	-0,06000	0,01772	0,012
A*A	0,03603	0,02612	0,210
B*B	-0,04897	0,02612	0,103
A*B	-0,08750	0,02171	0,005
S = 0,04341	R ² = 98,3%		

Através das análises realizadas nos dois gráficos da figura 4a, 4b e da tabela 5 pôde-se observar que há um aumento significativo no teor de resíduo seco obtidos nos extratos preparados com o aumento da quantidade planta utilizada na preparação (M). Sendo sua relação demonstrada pela equação:

$$RS = 4,20828 + 0,10167M - 0,1971M.C_e. (R^2 = 98,30\%)$$

DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo encontrar, realizando planejamento e análises estatísticas de experimentos, as melhores condições operacionais do processo de extração por solução hidroetanólica de folhas de *Senna alexandrina* a partir da matéria-prima vegetal que foi devidamente caracterizada.

A caracterização da matéria-prima é algo primordial no âmbito farmacêutico, principalmente quando se trata de material vegetal, pois garante a padronização do insumo dentro de especificações pré-definidas. Particularmente, a especificação da granulometria do pó é importante no processo de extração, pois a área superficial das partículas sofre influência desta, no entanto, um pó muito fino não é desejado uma vez que pode favorecer a formação de aglomerados que podem acabar prejudicando a extração.

O máximo teor de ativos (derivados hidroxiantracênicos expressos em senosídeo B) no extrato preparado foi obtido a partir dos níveis referentes a 60% (v/v) de etanol na solução extrativa hidroetanólica. O efeito do método de extração não foi significativo nem para a extração de senosídeos B (SB) nem para o teor de resíduo seco (RS), no entanto, o método por maceração com aquecimento e agitação foi escolhido para as análises de superfície de resposta, pois apresentou melhor resultado geral além de possuir um tempo de preparo menor. O aumento da massa da planta de 15g para 17,5 e 20 g não apresentou efeito significativo na extração de SB, provavelmente devido a ocorrência de saturação quando esta relação é extrapolada. Além disso, os resultados obtidos com o deslocamento destes níveis, para a resposta RS mostraram que ao aumentar a quantidade de planta utilizada na preparação do extrato fluido de sene houve um aumento significativo do teor de RS. Portanto o aumento da quantidade de planta além de 15g não se mostra necessário, pois a preparação do extrato fica mais difícil com maior quantidade e o custo do extrato aumenta, além disso, diminui bastante a relação SB/RS que com isso diminuirá o

teor de SB no extrato seco de sene após uma futura secagem por processos como *spray drying*.

Diante dos resultados do trabalho, sugere-se a combinação das seguintes condições de operação para a otimização do processo de extração da *Senna alexandrina*: 60% de etanol na solução extrativa, 15 g de planta e o emprego do método maceração com aquecimento e agitação.

ABSTRACT

Optimization of conditions for hydroethanolic extraction of sennosides FROM Senna alexandrina MILL leaves employing factorial design

***Senna alexandrina* Mill is an erect shrub, native to Arabia but widely cultivated in India, that is widely employed as a purgative for acute constipation and when defecation is advisable, such as before or after abdominal surgery. It is used in the form of powder, syrup, tablets and capsules. As these formulations are typically prepared from derivatives of the liquid extract, it is crucial for both quality and efficiency that the extraction process is optimized. The aim of this study was to establish optimal conditions for hydroethanolic extraction of *Senna alexandrina* leaves, by employing a 2³ full factorial experimental design with a central point (three factors and two levels), where the factor levels were coded as -1 (low), 0 (central point) and 1 (high), and response surface methodology, to assess the influence of the solvent, the amount of plant and the extraction method on the yield of hydroxyanthracene derivatives, expressed as sennoside B (SB), and on the dry matter (DM) in the prepared liquid extracts. Full factorial runs were conducted, one being carried out with the levels adjusted following the analysis of the first design. Upon the assessment of the response surface with adjusted levels, the optimum range for extraction of hydroxyanthracene derivatives, expressed as SB, was determined. The best SB/DM ratio was achieved by using 60% (v/v) ethanol/water solvent, 15 g of the plant and extraction with heating and stirring.**

Keywords: Factorial Design. Extraction. *Senna alexandrina*. Process optimization.

REFERÊNCIAS

- Brasil JL et al. Planejamento estatístico de experimentos como uma ferramenta para otimização das condições de biossorção de Cu (II) em batelada utilizando-se casca de nozes pecã como biossorvente. *Quim. Nova*. 2007;30(3):548-53,
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE 899 de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília: Anvisa; 2003.
- Carvalho ACB, Balbino EE, Maciel A, Perfeito JPS. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Rev. Bras. Farmacogn*. 2008;18(2):314-9.
- Chaubey M, Kapoor VP. Phytochemistry Division, National Botanical Research Institute, *Rana Pratap Marg*, Lucknow-226 001, India; 2001.
- Collete VL, Araújo CL, Madruga SW. Prevalência e fatores associados à constipação intestinal: um estudo de base populacional em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, 2007. *Cad. Saúde Pública*. Rio de Janeiro. 2010;26(7):1391-1402.
- De Campos AM 1996. Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hill. Aquifoliaceae (erva-mate). [Dissertação]. Porto Alegre: UFRGS; 149p.
- ESCOPE-European Scientific Cooperative on Phytotherapy. Monographs on the medicinal uses of plant drugs. Exeter, Reino Unido: University of Exeter; 1996-1997.
- Farmacopéia Brasileira. 5ª ed. Brasília: Anvisa; 2010. v.2
- Farmacopéia Portuguesa. 9ª ed. Lisboa: Infarmed; 2010.
- Masters K. *Spray Drying Handbook*. 4th. ed. London: George Godwin; 1985.
- Montgomery DC. Introdução ao controle estatístico de qualidade. 4ª ed. Rio de Janeiro: LTC; 2004. p. 365-422.
- Rankell AS, Lieberman HÁ, Schiffman RF. Secagem. In: Lachman L, Lieberman HA, Kanig JL. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Lisboa: Calouste Gulbenkian; 2001. v.1. p. 83-112.
- Sonnenberg A, Koch TR. Physician visits in the United States for constipation: 1958 to 1986. *Dig Dis Sci*, 1989;34:606-11.
- Stewart WF, Liberman JN, Sandler RS, Woods MS, Stemhagen A, Chee E, et al. Epidemiology of constipation (EPOC) study in the United States: relation of clinical subtypes to sociodemographic features. *Am J Gastroenterol*. 1999; 94:3530-40.
- WHO monographs on selected medicinal plants. Genebra, Suíça: World Health Organization. 1999. v1. 289p.

Recebido em 5 de fevereiro de 2013

Aceito para publicação em 6 de maio de 2013

